

AFM 을 이용한 Bone Resorption Pit 부피의 정량화 Quantification of Osteoclastic Resorption Pit Volume using AFM

*김지현¹, 전옥희¹, 이승학¹, 김도원¹, 임창환¹, 이상우¹, 윤대성¹

*C.H. Kim(chihyun@yonsei.ac.kr)¹, O.H. Jeon¹, S.H. Lee¹, D.W. Kim¹, C.H. Im¹, S.W. Lee¹, D.S. Yoon¹
¹ 연세대학교 보건과학대학 의공학부

Key words : Bone resorption pit, Osteoclast, Volume, Atomic force microscopy (AFM)

1. 서론

우리 몸 안에서 골기질(bone matrix)과 골세포로 구성된 운동성 있는 조직 중의 하나인 뼈는 외부의 물리적 자극에 노출되면 뼈 세포 대사의 변화에 따라서 분해되고 재구성된다. 물리적 자극에 의한 조직의 손상 즉 골절, 운동량의 변화에 의한 변형, 또는 호르몬 불균형으로 인해서 골다공증, 골염, 그리고 골암과 같은 질환이 발생한다. 이러한 질환이 걸린 사람이나 동물의 뼈 내부에서 주된 반응을 일으키는 것은 파골세포(osteoclast)이다. 그러므로 뼈 관련 질환의 효과적인 치료를 위해서는 파골세포의 골 흡수에 따른 뼈에 나타나는 구조적 변화에 대한 연구가 필요하다.

파골 세포는 대식세포 중의 하나로 생체 내에 침입한 세균을 물리치거나 뼈나 교원질 조직을 흡수하는 기능을 가진다. 파골세포가 함유하고 있는 카텡신(cathepsin)과 금속 분해효소(metalloproteinase enzyme)는 교원질 뿐만 아니라 뼈 속에 있는 칼슘과 인을 분해시킨다 [1]. 이 과정에서 파골 세포는 뼈 표면에 삼차원적인 구멍이 형성되게 되는데 이를 *in vitro* 에서 “resorption lacunae” 또는 “pit”이라 부른다.

현재 파골세포에 의한 흡수 정도를 분석하기 위해 사용하는 방법은 다음과 같다. 뼈 표면의 pit 을 효소조직염색 (immunohistological staining)과 조직화학염색(histochemical staining)을 수행한 이후 공초점 현미경(confocal microscope)과 전자 주사 현미경(scanning electron microscope, SEM)을 이용하여 단위 면적 당 증가된 pit 의 면적 그리고 증가된 pit 의 개수를 통하여 시간이 지남에 따른 뼈 흡수 정도를 이차원적으로 예측해 볼 수 있다. 그러나 *in vivo* 에서 뼈는 삼차원적인 구조를 가지고 있으므로 pit 의 면적만을 이용하여 파골세포의 활성도나 뼈 흡수 정도를 판단하기에는 정확하지 않는 부분이 많다.

조골세포의 경우 뼈 생성을 원자 전자 현미경(atomic force microscopy, AFM) 을 이용하여 부피적인 측면에 대한 연구가 진행되었다[2]. 하지만 파골세포에 의한 뼈 흡수율을 삼차원적인 측면에서 분석한 연구는 아직 보고되지 않고 있다. 이 연구는 AFM 을 이용하여 파골세포에 의한 상아 시편의 흡수율을 면적, 깊이 그리고 부피로 정량화 하기 위한 방법을 제시한다.

2. 재료 및 방법

Isolation and culture of osteoclasts

쥐에서 채취한 대퇴골의 골강(bone cavity)으로부터 대식 세포(macrophage)군으로 osteoclast 로의 분화가 가능한 골수세포를 분리해낸다. 골수세포를 37°C, 5% CO₂ 의 incubator 에서 α-MEM, 10% FBS, 1% P/S, 25ng/ml macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)을 포함한 배지를 넣고 약 2~3 일 동안 배양한다 [3]. 그 후, 골수세포에 35ng/ml receptor activator for nuclear factor κB ligand (RANKL)을 추가로 넣고 배지와 함께 약 10~14 일 동안 배양하였으며, 배지는 3 일 에 한번 갈아주었다 (Fig 1).

Two-dimensional analysis of bone resorption

Osteoclast 가 배양되는 culture dish 에 0.02% EDTA 와 인산완충용액(PBS)을 넣어 osteoclast 만을 분리한다 [4]. 상아 시편(dentine)을 25ng/ml M-CSF, 35ng/ml RANKL, 0.1mL α-MEM 가 포함된 96-well plate 에 넣는다. 그리고 수확한 osteoclast 을 상아 시편에 넣고 3 주 동안 37°C, 5% CO₂ 의 incubator 에서 배양한다. Osteoclast 을 상아 시편에 심은 날을 기준으로 7, 14, 21 일이 지남에 따라 변화된 pit 의 개수와 면적을 toluidine staining 을 사용하여 이차원적으로 분석한다 (Fig 2).

Atomic force microscopy

본 연구에서는 상아 시편 표면에 존재하는 pit 의 이미지와 부피의 정량화를 위해 AFM (Veeco multimodeV picoforce) 을 사용하였다 [5]. AFM 은 contact mode, 800mV setpoint, 200mV driving amplitude, 0.3Hz 의 scan rate, 512 samples/line, 그리고 256 lines 의 조건으로 이미지화 하였다 (Fig 3).

Matlab Analysis

Matlab 을 이용하여 pit 부피를 정량화 하기 위해 Fig 3 의 이미지를 text 파일로 변환한 후 Matlab 을 이용하여 이미지화 하였다 (Fig 4). Fig 3 에서 가장 낮은 높이를 보이는 곳 (빨간 원)을 잘라내어 부피를 분석해 보았다 (Fig 5).

3. 결과 및 고찰

Isolation and culture of osteoclasts

단핵의 골수세포와 3 개 이상의 핵을 지닌 osteoclast 가 함께 배양되는 모습이다 (Fig 1).

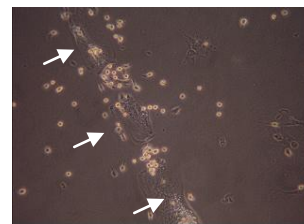


Fig. 1 Bone marrow cells were cultured for 10 days in presence of 25ug/ml M-CSF and 35ug/ml RANKL. Osteoclasts, the multinucleated cells, were observed.

Two-dimensional analysis of bone resorption

Osteoclast 에 의해 흡수된 상아 시편 표면의 pit 을 toluidine staining 을 이용하여 분석한 결과이다 (Fig 2). 같은 배율 (x10)의 면적에서 시간이 경과함에 따라 pit 의 숫자가 많아지나 면적은 비슷함을 볼 수 있다. 이차원적인 분석방법으로는 깊이와 부피를 측정하여 정량화 할 수 없기 때문에 상아 시편이 osteoclast 에 의해 흡수된 정도를 확실히 규정 지을 수가 없었다. 그러므로 AFM 으로 pit 의 깊이와 부피를 분석해 보았다.

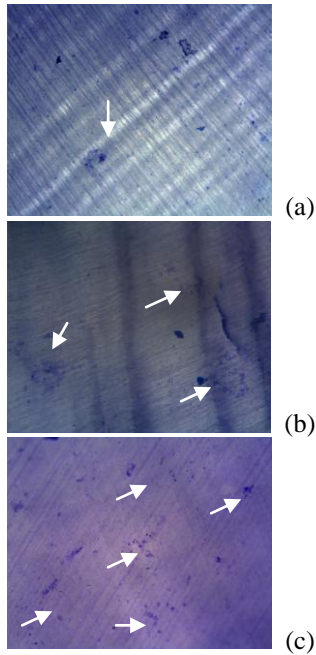


Fig. 2 Dentine discs cultured with osteoclasts for (a) 7, (b) 14, (c) 21 days were stained with toluidine blue. Bone-resorption pits (arrow) were observed on the dentine surfaces.

AFM analysis of dentine resorbed by osteoclasts

Osteoclast 을 7 일 동안 배양한 상아 시편을 AFM 을 사용하여 최대 깊이가 약 1.5um 인 pit 을 57.3 μm X 57.3 μm의 height 이미지를 얻은 결과 이다 (Fig 3).

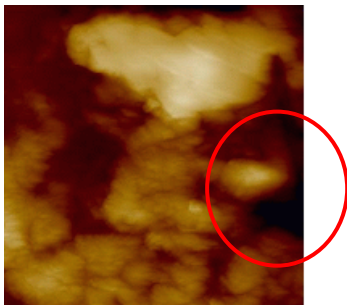


Fig. 3 Topographic AFM height image displaying the dentine which was resorbed by osteoclasts for 7 days. ('dark' area, red circle; pit depth:~1.5um)

Matlab Analysis

Volume 정량화 하기 위해 Matlab 을 이용하여 Fig 3 의 height 이미지를 text 파일로 변환한 후 plot 한 이미지이다 (Fig 4). 각각의 데이터 포인트를 이용하여 원하는 부분의 체적분, 즉 부피 값을 얻을 수 있다.

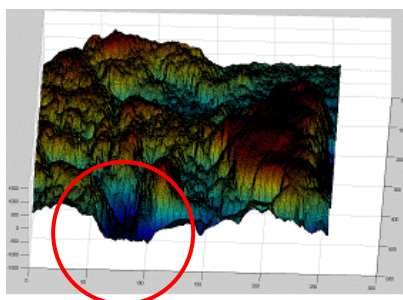


Fig. 4 The three-dimensional reconstruction of resorption pit by transforming height image scanned by AFM to text file.

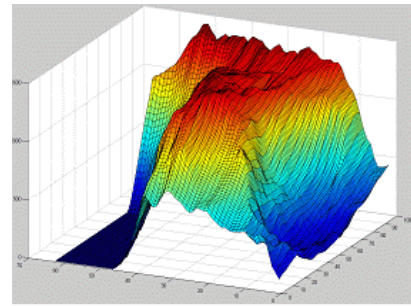


Fig. 5 A three-dimensional version of resorption pit from Fig 4 (red circle) turned upside down for preparation of volumetric integration

4. 결론

본 연구의 최종 목적은 osteoclast 에 의해 흡수된 상아시편 pit 의 부피를 정량화하는 데에 있다. 위의 결과는 3 주 중 7 일 동안의 resorption pit 을 분석한 결과이며 현재 14 일, 21 경과 후의 resorption pit 의 부피를 분석 중에 있다. 각 sample 당 10 개 이상의 pit 을 분석하고 있으며, 이 결과의 평균값을 토대로 osteoclast 에 의한 resorption rate 을 구하고자 한다. 향후 3 주 이상의 실험, 또는 7 일 이하 주기의 분석을 통해 더욱 정확한 결과를 얻을 수 있으리라 기대한다.

이 연구는 AFM 을 이용하여 뼈 관련 질환에서 뼈의 흡수 정도를 nanoscale 로 분석을 하고 또한 pit 의 volume 을 정량화하는 새로운 시도로써 의미를 가진다.

참고문헌

1. Zhenpeng Li, Kangmei Kong, Weili Qi., "Osteoclast and its roles in calcium metabolism and bone development and remodeling", Biochemical and Biophysical Research Communication, 343, 345-350, 2006.
2. L Klemmt Andersen et al., "Cell volume increase in murine MC3T3-E1 pre-osteoblasts attaching onto biocompatible tantalum observed by magnetic AC mode atomic force microscopy", European cells and materials, 10, 61-69, 2005.
3. Naoyuki Takahashi et al., "Generating murine osteoclasts from bone marrow", Methods Mol Med, 80, 129-144, 2003.
4. Karen Fuller et.al., "Murine osteoclast formation and function: Differential regulation by humoral agents", Endocrinology, 147, 1979-1985, 2006.
5. Tue Hassenkan, Henrik L. and Jes Bruun Lauritzen, "Mapping the imprint of bone remodeling by atomic force microscopy", The Anatomical Record Part A, 288A, 1087-1094, 2006.